

اثر عصاره سیر بر لیشمانیوز جلدی از طریق افزایش نیتریک اکساید

دکتر کاظم احمدی*، دکتر عباس محمودزاده♦، دکتر عبدالمجید چراغعلی**، علی اکبر اصفهانی♦♦

چکیده:

تولید نیتریک اکساید در بهبود زخم لیشمانیایی در حیوان و انسان مهم است. در این تحقیق اثر درمانی عصاره سیر به تنهایی یا همراه با ویتامین A با اثر داروی استاندارد گلوکانتیم در بهبود زخم لیشمانیایی و تولید نیتریک اکساید در مدل حیوانی مقایسه گردید. تعداد 1×10^5 عدد فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور به قاعده دم موش تزریق گردید. پس از به وجود آمدن زخم قطر آن اندازه گیری شد. موشها روزی دو بار با داروهای فوق و حداکثر به مدت ۴۵ روز به صورت موضعی تحت درمان قرار گرفتند. قطر زخم در طی روزهای ۱، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۵ روز اندازه گیری شد. در تجربه جداگانه ای ماکروفاژهای صفاقی همین موشها در محیط کشت از لحاظ میزان تولید نیتریک اکساید در پاسخ به لیپوپلی ساکارید مورد آزمایش قرار گرفته و مقدار ترشح نیتریک اکساید به روش گریس اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که درمان ۳۰ روزه با عصاره آبی سیر باعث کاهش قطر زخم می گردد. با این وجود حداکثر کاهش زخم در پاسخ به ۴۵ روز درمان و استفاده موضعی ۱۰ روز پماد ویتامین A قبل از استعمال عصاره آبی سیر به دست آمد. در موشهایی که سطح بهبودی زخم در آنها بیشتر بود مقدار نیتریک اکساید تولیدی نیز زیادتر بود.

واژه های کلیدی: لیشمانیازیس، سیر، نیتریک اکساید.

مقدمه:

سیر از خانواده زنبق با نام علمی *Allium Sativum* و دارای ترکیبات گوناگون است. هر چند بوی سیر ناشی از ماده آلیسین است ولی قبل از بریده شدن و یا خرد شدن بویی نداشته و یا بسیار ضعیف می باشد. به نظر می رسد که در نتیجه بریده شدن یا خرد شدن سیر این امکان به وجود می آید که آنزیمی بنام آلیناز با ماده آلیسین تماس حاصل و آلیسین را به وجود می آورد (۶). سیر از زمانهای قدیم در درمان بعضی از بیماریهای

عفونی استفاده می شده است. قبل از این که آنتی بیوتیک جدید در دسترس افراد قرار گیرد در اپیدمیهای تیفوس، وبا، اسهال خونی، دیفتری و سل از سیر استفاده می شد. در بین ترکیبات سیر اثر ضد باکتری آلیسین قابل توجه است و حتی در رفتهای یک صد هزارم تأثیر مهاری بر رشد باکتریهای گرم منفی و مثبت مثل استرپتوکوکها، استافیلوکوکها و ویبریوکلا داشته است (۹). خواص ضد باکتریایی قوی در مورد سویه های

* عضو هیأت علمی گروه ایمنولوژی - دانشکده پزشکی: دانشگاه علوم پزشکی بقیة الله «عج» - صندوق پستی ۵۴۶-۱۹۹۴۵، تلفن: ۸۰۵۳۷۶۹، فاکس:

۸۰۴۰۱۰۶ (مؤلف مسئول). ♦♦ عضو هیأت علمی گروه انگل شناسی - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیة الله «عج».

** عضو هیأت علمی گروه فارماکولوژی - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیة الله «عج».

مقاوم شیگلا نیز گزارش شده است (۱۶). سیر همچنین همواره درمان موفق برای بیماری مهلک مننژیت قارچی بوده است (۷).

بعضی از ترکیبات سیر مثل آلکین آلیل متیل تیو سولفینات دارای خاصیت ضد ویروسی بوده که این خاصیت آن را به دلیل ممانعت از جذب یا نفوذ ویروس دانسته‌اند (۱۵). مدارکی دال بر تأثیر درمانی عصاره سیر بر بعضی از بیماریهای انگلی مثل همینولپیس نانا و بیماری ژیاودیازیس گزارش شده است (۶). Andrew و همکاران در سال ۱۹۹۶ تأثیر آلوم ساتیوم (یکی از ترکیبات آلی عصاره سیر) را در موشهای آلوده به تریانوزوم مورد بررسی قرار داده و گزارش نمودند که این عصاره به میزان ۵ میلی گرم در میلی لیتر قادر است بیماریزایی انگل را سرکوب نماید (۱).

مطالعاتی نیز در سالهای اخیر بر روی اثرات عصاره سیر بر زخم لیشمانیوز شده است. محققین تأثیر آن بر انگل لیشمانیا را از طریق تقویت سیستم ایمنی می‌دانند. دکتر غفوریان (۱۴) نشان داده که تجویز خوراکی سیر به حیوان باعث افزایش ایمنی سلولی می‌گردد. دکتر غضنفری و همکاران اثر عصاره سیر بر رشد انگل لیشمانیا و بهبود زخم را مطالعه و گزارش نموده است که مکانیزم آن از طریق افزایش سایتوکاین‌های مترشحه توسط سلولهای T تایپ ۱ (Th1) صورت می‌گیرد (۱۰). مؤلف و همکاران نیز طی مطالعه‌ای نشان دادند که عصاره سیر از طریق تقویت فعالیت ماکروفاژها و افزایش ترشح نیتریک اکساید باعث کاهش رشد انگل در محیط کشت می‌گردد (۲).

مواد و روشها:

تهیه عصاره سیر:

مقدار ۵۰۰ گرم سیر همدان را پس از جدا کردن پوست آن به مدت یک شب در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده و سپس با چاقو شکافی در آن ایجاد

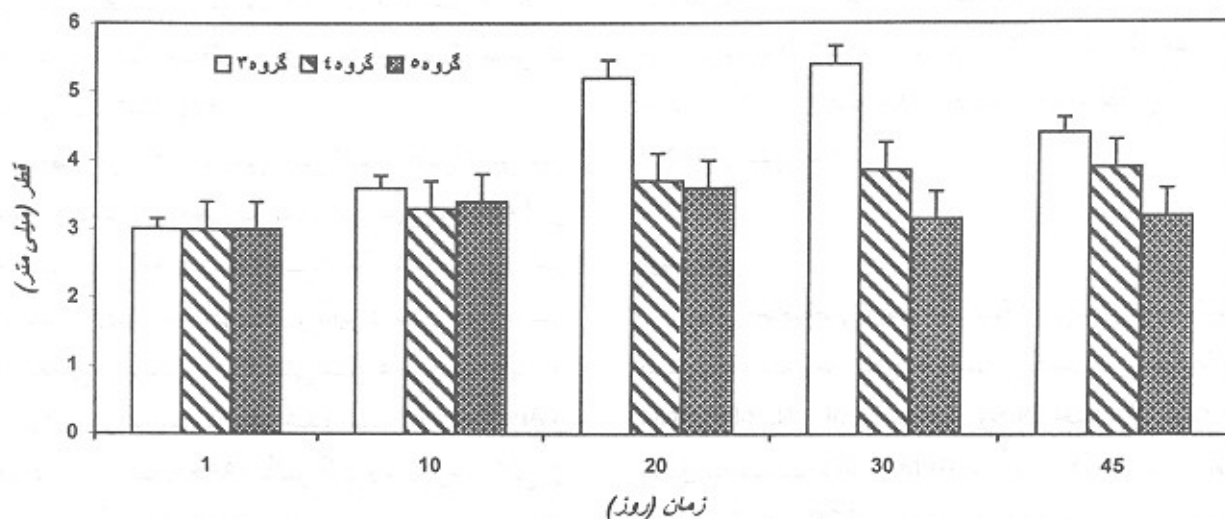
گردید. مقدار ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه و در آسیاب مخلوط شد. با استفاده از پارچه استریل عصاره به دست آمده از تفاله جدا گردیده و حجم نهایی آن به ۱۳۰ میلی لیتر رسید.

تهیه انگل:

سوس اختصاصی انگل از دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهیه و پس از کشت در محیط NNN (Novy - Mac Neal - Nicolle) جهت پاساژهای بعدی به محیط RPMI 1640 حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو (FCS) و مقدار مناسب آنتی بیوتیک استرپتومایسین و پنی سیلین اضافه گردید. پس از رشد و تکثیر و به دست آوردن تعداد کافی انگل جهت تزریق به موش شمارش شدند. سوسپانسیونی حاوی تعداد 1×10^6 انگل در هر میلی لیتر تهیه و مقدار 1×10^5 انگل در حجم یک دهم میلی لیتر در زیر جلد در انتهای قاعده دم هر موش تزریق گردید. بدین ترتیب ۴۲ سر موش با ۸ هفته سن خریداری شده از انستیتو تحقیقات رازی کرج با انگل فوق آلوده گردیدند.

درمان:

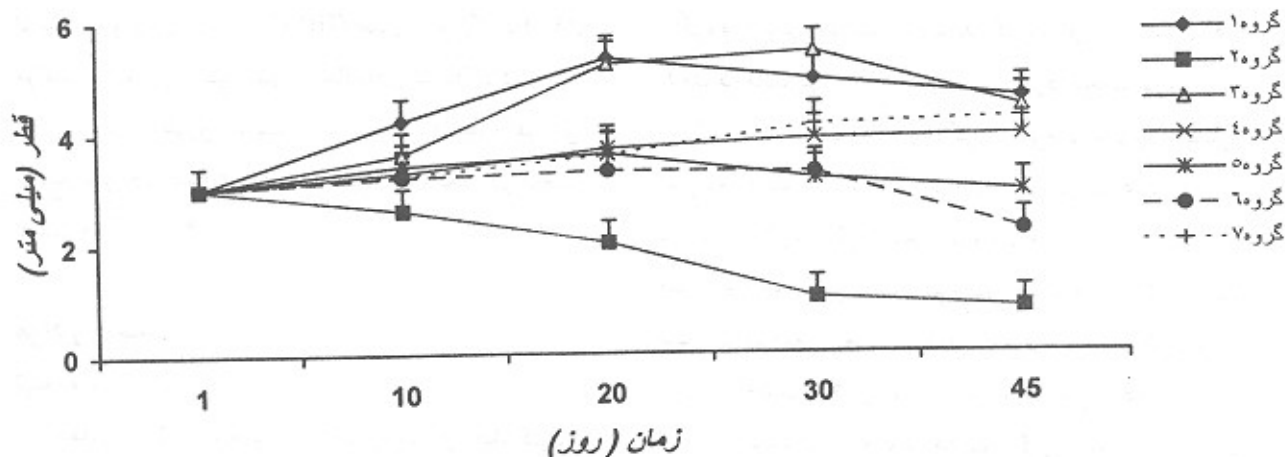
پس از بالا آمدن زخم قطر آن اندازه گیری و موشها در ۷ گروه ۶ تایی تقسیم گردیدند. گروه اول گروه شاهد بدون درمان، گروه دوم گروه استاندارد تحت درمان با گلوکاتیم به مدت ۲۰ روز، گروه سوم درمان با عصاره سیر به مدت ۱۰ روز، گروه چهارم درمان با عصاره سیر به مدت ۲۰ روز، گروه پنجم گروه درمان با عصاره سیر به مدت ۳۰ روز، گروه ششم ابتدا به مدت ۱۰ روز به صورت موضعی تحت درمان با پماد ویتامین A بوده و سپس به مدت ۳۰ روز به صورت موضعی از عصاره سیر استفاده گردید، گروه ۷ به مدت ۴۰ روز تحت درمان با پماد ویتامین A قرار گرفت. قطر زخم در روزهای ۱، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۵ روز اندازه گیری و مورد تجزیه و تحلیل



نمودار شماره ۱: اثر درمانی عصاره سیر در زمانهای مختلف.

و ۴۵ روز موشها کشته و ماکروفازهای صفاقی آنها به دست آمد (۱). برای این کار مقدار ۵ میلی لیتر PBS (Phosphate - Buffer - Salin) سرد، را به وسیله سرنگ به داخل صفاق موش تزریق کرده و پس از چند دقیقه ماساژ مایع صفاقی خارج گردید. پس از سانتریفوژ و ۳ بار شستشو با PBS سرد سلولها شمارش و

آماری قرار گرفت. از تمامی زخمها نمونه گیری به عمل آمده و وجود انگل در زخم و همچنین آلودگی میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. در یک تجربه مجزا به منظور اندازه گیری مقدار نیتریک اکساید ۷ گروه ۶ تایی موش شبیه فوق تحت درمان قرار گرفتند. پس از زمانهای مشخص ۱۰، ۲۰، ۳۰



نمودار شماره ۲: مقایسه گروههای ۷ گانه در زمانهای مختلف.

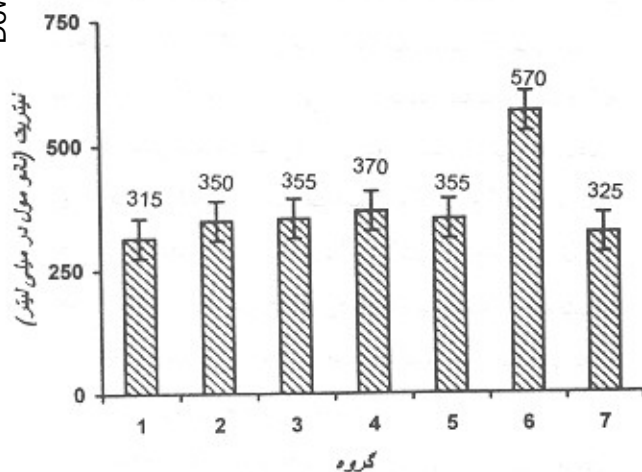
سوسپانسیون سلولی تهیه شد. سلولها در محیط کشت بدون فنول رد به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 در هوا انکوبه شدند. پس از مدت مذکور با PBS گرم سطح پلیتها شسته و بدین وسیله سلولهای آزاد موجود در سطح پلیت (سلولهای غیر چسبنده) یعنی سلولهای غیر ماکروفاژی به آرامی خارج گردیدند. ماکروفاژها در محیط کشت بدون فنول رد به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 در هوا انکوبه شدند. مقدار نیتريت موجود در مایع رویی به عنوان اندیکاتوری از نیتريك اكساید به روش گریس (Greiss) اندازه گیری شد (۱). نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آماری Chi-Square مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج:

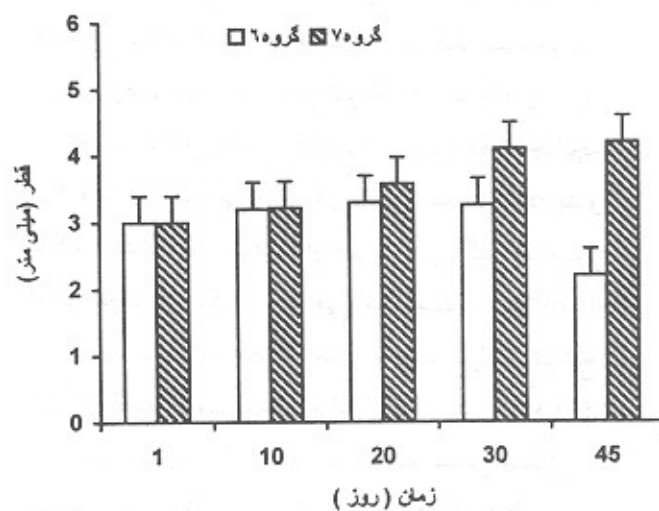
نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره سیر به مدت ۱۰ روز درمان قادر به توقف گسترش زخم نبود به طوری که قطر زخم در روز دهم از ۳ میلی متر در روز اول به ۳/۶ میلی متر در روز دهم رسید (نمودار شماره ۱). در حالی که در گروه ۴ و ۵ از گسترش زخم در روز بیستم

جلوگیری شده بود ولی در گروه سوم که درمان پس از ۱۰ روز متوقف گردید گسترش زخم رو به افزایش و قطر آن به ۵/۲ میلی متر رسیده است. این در حالی است که قطر زخم در گروههای ۴ و ۵ در روز بیستم به ترتیب ۳/۷ و ۳/۶ افزایش یافته بود. مقایسه قطر زخم در گروهها نشان می دهد که در روز ۳۰م قطر زخم در گروههای ۴ و ۵ مهار و به ترتیب به ۳/۳ و ۳/۱ میلی متر رسیده است در حالی که در گروه ۳ (۱۰ روز درمان) قطر زخم در روز ۳۰م برابر با ۵/۴ میلی متر بود (نمودار شماره ۲). نمودار شماره ۳ نشان می دهد که استفاده موضعی از پماد ویتامین A به مدت ۱۰ روز قبل از استعمال ۳۰ روزه عصاره آبی باعث بهبود و کنترل زخم گردیده است ولی پماد ویتامین A به تنهایی در مدت ۴۰ روز درمان در مقایسه با گروه شاهد نتوانسته است که زخم را کنترل نماید.

نتایج حاصل از اندازه گیری نیتريك اكساید توسط ماکروفاژهای صفائی به دست آمده از موشهای مورد آزمایش پس از تحریک با لیپوبلی ساکارید نشان داد که (نمودار شماره ۴) مقدار نیتريت در گروه اول برابر با ۳۱۵ نانومول در هر میلی لیتر بود. در حالی که مقدار آن



نمودار شماره ۴: نیتريك اكساید مترشحه توسط ماکروفاژهای صفائی موش (نیتريت به عنوان اندیکاتور NO).



نمودار شماره ۳: مقایسه اثر ویتامین A (۷) و ترکیب ویتامین A و عصاره سیر (۶).

در گروه استاندارد برابر با ۳۵۰، در گروه ۱۰ روز درمان ۳۵۵، در گروه ۲۰ روز درمان ۳۷۰، در گروه ۳۰ روز درمان برابر با ۳۵۵ نانومول در هر میلی لیتر بود که این تفاوت در مقایسه با گروه اول معنی دار می باشد ($P < 0/05$). مقدار نیتريت مترشح توسط ماکروفاژهای صفاقي به دست آمده از گروه تحت درمان با پماد ویتامین A و عصاره سیر برابر با ۵۷۰ نانومول در چاهک بود که نشان دهنده اثر مضاعف پماد ویتامین A و عصاره سیر بر ترشح نیتريك اكسايد می باشد در حالی که در گروه ۷ وقتی که پماد ویتامین A تنها استفاده شد مقدار ترشح نیتريك اكسايد آن ۳۲۵ نانومول بود که تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشت.

بحث:

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که درمان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز با عصاره سیر توانایی کنترل زخم لیشمانیایی را دارد ولی رضایت بخش نیست. با توجه به اینکه عدم نتیجه مطلوب طی ۳۰ روز درمان می تواند به دلیل عدم نفوذ سیر در زخم باشد از پماد ویتامین A به صورت موضعی استفاده شد تا این که عصاره سیر بتواند به زخم نفوذ یابد. نتایج حاصل از ترکیب توام پماد ویتامین A با عصاره سیر نشان داد که رضایت بخش بودن نتایج با درمان ۳۰ روز می تواند به دلیل عدم جذب عصاره سیر باشد. لذا می توان چنین تفسیر نمود که عصاره سیر بهبود فوری زخم لیشمانیایی را باعث نمی گردد و دلیل آن هم ماهیت مکانیزم کشته شدن انگل می باشد. زخم لیشمانیایی ناشی از وجود و تکثیر انگل است. از طرفی فاکتورهای تعیین کننده عفونتهای لیشمانیایی انسانی کاملاً روشن نیستند هر چند می توان آنرا به القاء ایمنی سلولی نسبت داد.

درک فعلی ما از پاسخهای ایمنی در لیشمانیوز متکی به نتایج به دست آمده از مدل های حیوانی به ویژه عفونت لیشمانیا ماژور در موش می باشد (۸). کنترل مؤثر

عفونتهای لیشمانیایی در انسان و موش از طریق فعال سازی مکانیزمهای متعدد اختصاصی و غیر اختصاصی ماکروفاژها صورت می گیرد. تولید و ترشح نیتريك اكسايد یکی از عوامل مؤثر در این فرآیند می باشد (۱). تولید نیتريك اكسايد با مکانیزمهای حفاظتی بر ضد لیشمانیا و پاتوژنهای داخل سلولی دیگر ارتباط دارد. در این مطالعه نتایج نشان داد که بین نیتريك اكسايد مترشح توسط ماکروفاژها و بهبود زخم در گروههای تحت درمان با عصاره سیر در زمانهای مختلف و استعمال پماد ویتامین A در مقایسه با گروه شاهد و استاندارد تفاوت معنی داری وجود دارد ($P < 0/05$). در حالی که مقدار نیتريك اكسايد مترشح توسط ماکروفاژهای موشهای تحت درمان با پماد ویتامین A و عصاره سیر در مقایسه با گروه شاهد بسیار بالا است (۷۸/۱۲٪ افزایش) در گروه استاندارد مقدار نیتريك اكسايد فقط ۱۰/۹۳ درصد افزایش داشته است. این نتایج نشان می دهد که کنترل زخم توسط عصاره سیر احتمالاً از طریق افزایش ترشح نیتريك اكسايد صورت گرفته در حالی که گلوکاتیم به طور مستقیم و مستقل از نیتريك اكسايد باعث بهبودی زخم لیشمانیوز گردیده است. در این رابطه تجربیات قبلی احمدی و همکاران نشان داده که عصاره سیر قدرت تحریک ماکروفاژها و افزایش ترشح نیتريك اكسايد را دارد (۹). تجربیات قبلی ما و دیگران (۴) نشان داده که چنانچه ماکروفاژهای صفاقي موش در حضور لیپوپلی ساکارید و یا گاما اینترفرون یا ترکیبی از هر دو قرار گیرند، منبع اصلی تولید نیتريك اكسايد می باشد. مطالعات *In vivo* نیز نشان داده که عصاره سیر باعث افزایش ترشح سایتوکاینهای مربوط به Th1، Th2 می گردد (۱). سایتوکاینهای Th1 را تقویت کننده ایمنی سلولی و سایتوکاینهای Th2 را مهار کننده آن می دانند. به طور مثال تجربه قبلی ما نشان داده که اینترلوکین ۶ باعث مهار ترشح نیتريك اكسايد توسط ماکروفاژهای صفاقي

نتیجه گیری:

پس از قابل نفوذ شدن زخم در اثر استفاده موضعی از پماد ویتامین A عصاره سیر در طی درمانی ۳۰ روزه قادر است از گسترش زخم لیشمانیوز پوستی جلوگیری و باعث بهبودی زخم گردد و این بهبودی احتمالاً مرهون افزایش تولید نیتریک اکساید می باشد. لذا ترکیب توأم ویتامین A با عصاره سیر با فرمول و پایه مناسب جهت تحقیق در مدل انسانی پیشنهاد می شود.

تشکر و قدردانی:

از کلیه کسانی که با ما در این طرح همکاری نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

می گردد (۲). به عبارتی عصاره سیر می تواند در داخل بدن از طریق تحریک لنفوسیت های T و ترشح سایتوکاین های مربوطه باعث افزایش فعالیت ماکروفاژها شده و هم می تواند احتمالاً به طور مستقیم باعث تحریک ماکروفاژها گردد. در هر دو صورت نتیجه حاصله عبارت از افزایش سطح نیتریک اکساید می باشد. در این رابطه غفوریان (۳) نشان داده که تجویز خوراکی سیر به حیوان باعث افزایش سطح ایمنی سلول می گردد. لذا با درک فعلی ما از مکانیزم ایمنی سلولی و ماکروفاژها به نظر می رسد که تجویز موضعی عصاره سیر در این تحقیق به کندی جذب شده لذا قدرت تحریک فوری سلول های T و ماکروفاژها را نداشته و می تواند یکی از دلایل طولانی شدن بهبود زخم باشد.

منابع:

- ۱- احمدی کاظم؛ پندونه علی؛ اصفهانی علی اکبر. اثر عصاره سیر بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش. مجله علوم پایه پزشکی ایران، ۳(۲): ۶۰-۵۶، ۱۳۷۹.
- ۲- احمدی کاظم. نقش تنظیمی هورمون ۵-آلفا دی هیدرو تستوسترون بر ترشح اینترلوکین ۱۰۶. مجله پزشکی کوثر، ۲(۴): ۳۷-۲۲۹، ۱۳۷۶.
- ۳- غفوریان مهری. مطالعه اثرات آیمونولوژیکی و هیستولوژیکی سیر. پنجمین کنگره ایمونولوژی ایران. دانشگاه تربیت مدرس، ۱۲۷، ۱۳۷۹.
- 4- Ahmadi Renani K.; McCruden AB. Sex differences in macrophage nitric oxide production. Iranian Journal of Medical Sciences, 23(1-2): 42-7, 1998.
- 5- Andrew N.; Williams S. Allium sativum - induced death of african trypanosomes. Parasitol Res, 82: 634-7, 1996.
- 6- Block E. The organosulfur chemistry of the genus allium implications for the organic chemistry of sulfur. Angew, Chem Int Ed Eng, 31(9): 1135-78, 1992.
- 7- Buates S.; Matlashewski G. Treatment of experimental Leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: Efficacy and mode of action. J Infect Dis, 179(6): 1485-90, 1999.
- 8- Bogdan C. Leishmaniasis: Principles of the immune response and function of nitric oxide. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 111(11-12): 409-14, 1998.
- 9- Chowdhury Ak.; Ahsan M.; Islam SN.; Ahmed ZU. Efficacy of aqueous extract of garlic & allicin in experimental Shigellosis in rabbits. Indian J Med Res, 93: 33-6, 1991.
- 10- Desjeu P. Human Leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. World Health Star, 45(2-3): 267-75, 1992.
- 11- Elshami MA. Antifungal property of garlic clove juice compared with fungicidal treatments against fusarium. Egyption J Phytopathology, 17(1): 55-62, 1987.

- 12- Ghazanfari T.; Hassan ZM.; Ebtekar M.; Ahmadian A.; et al. Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major* infected Balb/c mice. Scand J. Immunol, 52(5): 491-95, 2000.
- 13- Green S.; Nacy C.; Meltzer M. Cytokine - induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. J Leuko Biol, 50: 93-103, 1991.
- 14- Vouldoukis I.; Riveros-Moreno V.; Dugas B.; Becherel P. The killing of *Leishmania major* by macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon R11/CD23 surface antigen. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 78048-55, 1995.
- 15- Vouldoukis I.; Becherel P.; Riveros-Mareno V.; Dugas B. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreased nitric oxide generation. Eur J Immunol, 27: 8605-9, 1997.
- 16- Weber ND.; Anderson DO. *In vitro* virucidal effects of *Allium sativum* (garlic extract and compounds). Planta Med, 58: 417-23, 1992.